

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-267897

(43)公開日 平成4年(1992)9月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/68	A	8114-4B		
C 12 N 15/10				
G 01 N 33/53	N	8310-2J 8828-4B	C 12 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数1(全6頁)

(21)出願番号	特願平3-27468	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成3年(1991)2月21日	(72)発明者	福田 薫 神奈川県横浜市緑区鶴志町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名)

(54)【発明の名称】 DNA又はRNAの検出方法

(57)【要約】

【構成】 試料中の1本鎖DNA又はRNAを、ポリビニリデンジハライド膜に担持し、ジゴキシゲニンで標識された相補的なDNA鎖をアニールさせた後、該DNA鎖中のジゴキシゲニンを酵素免疫測定法で検出することにより、該試料中のDNA又はRNAを検出する。

【効果】 放射性標識を用いることなく高感度で目的とするDNA又はRNAを検出することができる。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出しようとするDNA又はRNAを錠型として、(1)ジゴキシゲニンで標識されたd-X<sup>1</sup>TP(式中、X<sup>1</sup>はA、G、C、T又はUで表わされるデオキシリボヌクレオチドを表わす。)、(2)A、G、C、T及びUから選ばれるX<sup>1</sup>以外の3種のデオキシリボヌクレオチド、(3)DNAポリメラーゼ又は逆転写酵素及び(4)ランダム・プライマーの存在下に合成して得られる標識された相補的なDNA鎖と、ポリビニリデンジハライドから成る担体に担持された試料中の1本鎖DNA又はRNAとをアニールさせた後、該相補的なDNA鎖中のジゴキシゲニンを免疫化学的手法により検出することを特徴とするDNA又はRNAの検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、非放射性標識を用いたDNA又はRNAの検出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】医学医療分野における細菌・ウイルス等の感染症診断、遺伝病の発症前診断や早期診断(予測)、法医学における個人識別、動・植物の病因診断や育種等への利用、生物製剤等の規格試験、食品分野などでは、遺伝子診断が急速に注目されつつある。特に、診断分野において従来多く採用されている抗原・抗体法や検出技術面では、例えば、感染抗原に対する抗体の產生に、あるいはウイルス検出のための感染細胞増殖のための培養に、数週間から数ヶ月を要することで診断結果が出るのに多大の時間を費やすという欠点を有していた。従来、DNA又はRNAの検出には標的(検体)の1本鎖DNA又はRNAに相補的な1本鎖DNAによるDNA-DNAあるいはDNA-RNA間の結合を形成させるハイブリダイゼーション法が用いられている。通常、標的に相補的なDNAは放射性同位元素(<sup>32</sup>P,<sup>35</sup>S,<sup>3</sup>H等)等で標識されDNAプローブと呼ばれる。これら核酸の相補的な結合は、アデニンとチミン及びグアニンとシトシンの間で起こる水素結合の塩基対形成による。この塩基対の形成は非常に正確に相手を認識するもので、このことがDNAプローブによる検出法の特異性を高いものにしている。

【0003】実際の検出操作は、固相担体法が広く採用されている。これは標的DNA又はRNAを担体に固定化させた後、DNAプローブによるハイブリダイゼーションを行なう方法で、担体にはニトロセルロース膜やナイロン膜が使われる。これらの担体の選択はDNA又はRNAの保持量やDNAプローブの非特異的結合等に大きく影響するため重要な因子となる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】まず、従来法は放射能を使用するため、取り扱い上あるいは安全上の問題がある。

10

30

40

50

る。特に、臨床検査部門等では放射能の使用は障害となるため非放射性標識法による検出法の開発が望まれている。近年、酵素標識をした抗原-抗体法やビオチン-アビシン法等による非放射性標識法が開発されつつあるが、検出感度の点で劣る状況にある。多くの場合、固相担体法が開発されているが、その検出系は酵素反応の生成物をニトロセルロース膜やナイロン膜に沈着させる方式でその沈着性が問題となる。沈着性が悪いと酵素反応生成物は不溶解性であるため、膜から脱離した状態となり、大きく検出感度に影響する。本法はこれらの点を改善した、脱放射性標識及び高検出感度の開発にある。他に、同様な方法による蛍光や化学発光を検出するシステムも開発されているが、正確性(測定値が安定しない)や高価な測定用の機器が必要なこともあり、実用上問題を残している。

## 【0005】

【問題点を解決するための手段】本発明者は、上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、非放射性標識法により迅速・簡便に目的とするDNA又はRNAを検出する方法を見出し、本発明に至った。即ち、本発明の要旨は、検出しようとするDNA又はRNAを錠型として、(1)ジゴキシゲニンで標識されたd-X<sup>1</sup>TP(式中、X<sup>1</sup>はA、G、C、T又はUで表わされるデオキシリボヌクレオチドを表わす。)、(2)A、G、C、T及びUから選ばれるX<sup>1</sup>以外の3種のデオキシリボヌクレオチド、(3)DNAポリメラーゼ又は逆転写酵素及び(4)ランダム・プライマーの存在下に合成して得られる標識された相補的なDNA鎖と、ポリビニリデンジハライドから成る担体に担持された試料中の1本鎖DNA又はRNAとをアニールさせた後、該相補的なDNA鎖中のジゴキシゲニンを免疫化学的手法により検出することを特徴とするDNA又はRNAの検出方法に存する。

【0006】本発明においては、まず、検出しようとするDNA又はRNAを錠型として、(1)非放射性のジゴキシゲニンで標識されたd-X<sup>1</sup>TP(式中、X<sup>1</sup>はA、G、C、T又はUで表わされるデオキシリボヌクレオチドを表わす)、(2)A、G、C、T及びUから選ばれるX<sup>1</sup>以外の3種のデオキシリボヌクレオチド、(3)DNAポリメラーゼ又は逆転写酵素及び(4)ランダム・プライマーをプライマー伸長法、ニック・トランスレーション法、ティリング法等によりプローブに取り込ませてDNAを標識して(Dig-dUTPはDigとdUTPの間が立体障害を考慮してスペーサーの介在により結合されている)、担体固定法によりポリビニリデンジフルロライド(PVDF)等のポリビニリデンジハライドに担持させた標的DNA又はRNAとのハイブリダイゼーションを行ない、標識DNA-RNA又は標識DNA-RNA結合(ハイブリッド)を形成させる。

【0007】このハイブリッドに酵素標識ジゴキシゲニン抗体、例えば、抗ジゴキシゲニン・アルカリホスファターゼ複合体；抗-D<sub>1</sub>g・ALPを付加し、酵素免疫測定法によってALPの基質であるBCIP（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸）とNBT（ニトロブルーテトラアソリウム塩）との発色反応により、標的DNA又はRNAを検出する。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0009】(1) ジゴキシゲニン標識DNAの合成・単離 10

①. ジゴキシゲニン標識d-X<sup>1</sup>TP (D<sub>1</sub>g-d-X<sup>1</sup>TP)

上述のd-X<sup>1</sup>TPにスペーサーを介してジゴキシゲニンを付加したものでDNA標識用の部位となるものである。このジゴキシゲニンを抗原として認識する抗ジゴキシゲニン抗体に酵素を付加させ、酵素の基質との反応により生ずる発色から酵素量、すなわちDNA量を検出しようとするものである。標識用の部位となるデオキシリコン酸種は相補性を有するものであれば、知られているデオキシ（アデノシン、グアノシン、シトシン、チミジン又はウリジン）三リン酸やそれらの誘電体であっても構わない。又付加する酵素種もアルカリホスファターゼ（ALP）、β-ガラクトシダーゼ、パーオキシダーゼ、ウレアーゼ等各種の酵素が利用できる。

【0010】

②. 標識DNAの合成方法

前述したようにいくつかの標識方法が知られているが、利用法は目的によりことなる。一般には標識用の部位の取り込み量が多く、高検出感度が期待出来るプライマー伸長法が有利である。まず標識用DNAを熱変性により1本鎖とし、これに各配列種からなるヘキサ・デオキシリコン核酸（ランダム・ヘキサマー）を加えて1本鎖DNAに付加させ、D<sub>1</sub>g-d-X<sup>1</sup>TP及びDNAポリメラーゼによる鎖（ヘキサマー）伸長反応を行ない、D<sub>1</sub>g-d-X<sup>1</sup>TPを取り込ませる。DNAポリメラーゼは反応の開始点としてオリゴマーペースを要求する。

【0011】

③. 標識DNAの単離方法

DNAポリメラーゼ反応物は分子量分画用ゲルによる単離・精製を行なう。

【0012】操作をなるべく簡便に行なうため、スピン・カラム（市販）と呼ばれるセファデックスG-25又はG-50を詰めたカラムを用い、2,000-3,000 rpm、2-4分の簡単な遠心分離により分画を行なう。精製の有無は目的に依存し高感度の検出を要求する場合は、取り込まれなかった過剰のD<sub>1</sub>g-d-X<sup>1</sup>TPによる非特異結合を避けるため精製操作は必要である。

【0013】(2) 標的のDNA又はRNA

検体中の標的DNA又はRNAは下記で述べる担体に担持するため前処理を行なう。検体中に蛋白質が共存する場合は蛋白質分解酵素（Proteinase-Kが適当）による分解を行なう。この操作は蛋白質が担体に結合することによりDNA又はRNAの結合を妨げることや標識DNAの非特異的結合の要因になること、及びDNA又はRNAの担持操作を障害（吸引法の場合）する等のため必要とする。諸妨害要因となるその他の物質の共存も除去操作が必要である（担体を通過する小分子は共存可能）。この様にして得られたDNAは1本鎖化しRNAはそのままの状態で担体に担持される。

【0014】その際、高検出感度を得るためにには、DNA又はRNAは長鎖の状態が好ましく断片化操作はしない。

(3) 担体

本発明で担体として用いられるポリビニリデンジハライドのうち、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）はイモビロンと言う名で市販されており入手可能である。PVDFは前処理として100%メタノールに浸し（約20秒間）、次いでドット・プロット用バッファー（1M酢酸アンモニウム等）もしくはサザン・プロット用バッファー（20×SSC、0.3Mアルカリ溶液等）等に浸けることが必要である。PVDF膜はテンプレート等によるドット・プロットやサザン・プロットによるDNA又はRNAの担持後、風乾し、さらに80℃、60分の加熱することにより、より強固な担体操作を受ける。

【0015】(4) ハイブリダイゼーション

DNA又はRNAの担持した担体はプロッキング剤（スキム・ミルク、牛アルブミン、ゼラチン等）により、標識DNAが結合しないように担持された部分以外の部分をプロックする。次いで、標識DNAが相補する2本鎖形成反応を行なう。ここで、担持したDNA又はRNA中に標識DNAに相補する領域が存在すれば、2本鎖結合が形成される。

【0016】(5) 検出方法

ハイブリダイゼーション後の担体を充分洗浄し、これに抗ジゴキシゲニン抗体・酵素複合体を加えて、DNAプローブに取り込まれたD<sub>1</sub>g-dUTPとの抗原・抗体反応を行なう。次いで、酵素の基質、たとえば、ALPの場合はBCIPとNBTを加えて発色反応を行なう。DNAプローブに相補する域が存在していれば、DNA又はRNAが担持された部位は濃い紫色に着色する。これを相応するDNAの標準曲線により定量する。着色部位の判定はデンシト・メーター等の機器の利用が有利である。

【0017】(6) 応用

本法は核酸の2本鎖結合の相補性を利用しているもので、解離した鎖の再結合の際一方の鎖の標識によりDNA又はRNAを検出しようとするものである。再結合の

5

際、相対するデオキシヌクレオチドを強く認識するために、特異性が高く精度の良い核酸検出法である。すなわち4つのデオキシヌクレオチドの組み合わせによる塩基配列は「4」のN乗となり、鎖が長くなれば、DNA又はRNA中に存在する同配列はほぼ皆無となる。よって、プローブの塩基配列の長さが非特異結合を避ける重要な因子となる。本法はこの高い特異性からくる精度面で遺伝子診断や生物製剤規格試験法あるいは法医学面等に有用である。

## 【0018】

【実施例】本発明について、以下に実施例を挙げてより詳細に述べるが、その要旨を越えない限り、これらに限定されるものではない。

## (実施例1) ドット・プロッド法

希釈用バッファー-TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) により標準曲線用のDNAであるpBR328(直鎖型、ベーリンガー・マンハイム社製)濃度の希釈系列を作成する。抗体とするPVDF膜(ミリポア社製)は使用前にメチルアルコールに20秒間浸け、その後、2×SSC(2倍のSSC溶液, 0.03M クエン酸三ナトリウム, 0.3M 塩化ナトリウム)に浸し調製しておく。希釈した標準DNA又は、サンプルDNAはドット・テンプレート(BioRad社製)を使用して軽い吸引下、PVDF膜に添加してPVDF-DNA結合を形成する。その際、DNAは0.3N NaOHあるいは95℃, 10分の加熱により1本鎖DNAとしておく。PVDF膜は次いで、2×SSCでよく洗浄後テンプレートから取り出し、風乾、80℃, 60分の加熱によりDNAをより強固にPVDF膜に固定させる。続いて、膜を0.1×SSC, \*30

20×SSC	5.0 ml	(5×SSC)
10%ラウロイルザルコシン	0.2 ml	(0.1%w/v)
10% SDS	0.04 ml	(0.02%w/v)
ブロッキング試薬	0.1 g	(0.5%w/v)
H <sub>2</sub> O	14.8 ml	

( ) 内は最終濃度

PVDF膜をハイブリダイゼーション・バッグ(コスモバイオ社製)に入れ、膜100cm<sup>2</sup>当たり16mlのハイブリダイゼーション溶液を加えて、68℃, 60分のプレハイブリダイゼーションを振盪下行なう。続いて、新しいハイブリダイゼーション溶液(4ml/100cm<sup>2</sup>)に交換して、D<sub>1</sub>g標識DNAを添加による68℃、一昼夜のハイブリダイゼーションを行なう(振盪下)。バッグから膜を取り出し、過剰の標識DNAを除去するため洗浄操作を行なう。

【0022】まず、室温で膜100cm<sup>2</sup>当たり50mlの2×SSC, 0.1%SDSを用いて5分、2回洗浄する。続いて、68℃、で0.1×SSC, 0.1%SDSを用いて15分、2回洗浄する。洗浄した膜は1%ブロッキング試薬を含むBuffer-1により37

50

\*0.1%SDS(ナトリウムデシルサルフェート)により68℃, 60分振盪下、洗浄する。洗浄後、膜はBuffer-1(100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5)に浸しておく。

## 【0019】DNAの標識

標識用DNAは標識化の前に95℃, 10分の加熱処理により1本鎖化し、ドライアイスで冷却しておいた水-アルコールのバスに浸け、急冷する。1.5mlエッペンドルフ・チューブに熱処理したDNA 1μg、ランダムヘキサヌクレオチド混合液(ベーリンガー・マンハイム社製)2μl、デオキシリボヌクレオチド三リン酸混合液(D1g-dUTPを含むベーリンガー・マンハイム社製)2μl、を加えて蒸留水で全量を19μlとする。これにDNAポリメラーゼ(クレノウエンザイム)1μl(ベーリンガー・マンハイム社製)を加えて37℃, 60分の酵素反応を行ない2μlのEDTA溶液(0.2M pH 8.0)により反応を停止する。続いて、標識されたDNAを精製する。DNA精製用スピンドルカラム(ベーリンガー・マンハイム社製)を準備し、室温下、カラム内の空気抜きを行なう。スイング型遠心器によりカラムを2,000rpm、2分遠心し、カラム内のバッファーを除去する。カラムに反応液を上層して同、2,000rpm、4分の遠心を行ない、遠心画分を得る。この遠心画分に標識DNAが含まれる。使用直前まで-20℃に凍結しておく(長期保存可能)。

## 【0020】ハイブリダイゼーションハイブリダイゼーション溶液を以下のように調製する。

## 【0021】

℃, 60分のブロッキングを行なう(振盪下)。

## 【0023】免疫学的検出

D<sub>1</sub>g標識DNAでハイブリダイズされた膜は、抗D<sub>1</sub>g抗体-アルカリホスファターゼ複合体(抗D<sub>1</sub>g-ALP)との反応を行なう。膜100cm<sup>2</sup>当たり4μlの抗D<sub>1</sub>g-ALP(ベーリンガー・マンハイム社製)を含む20mlのBuffer-1に膜を浸け、30分間振盪する。ALP標識された膜は、過剰の抗D<sub>1</sub>g-ALPを除去するため50mlのBuffer-1にて、15分、3回の洗浄を行なう(振盪下)。続いて、膜は20mlの100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5のBuffer-2に浸して2分間平衡化を行なった後、膜をハイブリダイゼーション・バッグに入れ20mlの発

色液を加え、アルミホイルに包み静置する。発色液の組成は45μl B C I P 液、35μl N B T 液（いずれもペーリンガー・マンハイム社製）をB u f f e r - 2 の10mlに溶かす。スポットあるいはバンドが検出された時点で、膜をバッグから取り出し50mlの10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 からなるB u f f e r に浸げることにより反応を停止する。発色反応により濃い紫色の沈殿物が検出される。

【0024】結果は湿った膜をコピーするか、あるいは写真によって記録する。別にデンシトメーターにより標準曲線から定量する。最高検出感度を測定した結果、0.1pgを検出し、放射能法に匹敵もしくはそれを越える検出感度を記録した。又、膜は80℃、60分の加熱により保存が可能である。

#### 【0025】(実施例2) サザン・プロット法

標準曲線用DNAとしてp B R 3 2 8 (制限酵素 Eco R 1, B g 1 1, H i n f 1 で別々に酵素分解したもの；断片の組成(大きさ)は4907, 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298×2, 234×2, 220, 154×2の塩基対から成る)を用いて希釈用バッファーTEにより該DNA濃度の希釈系列を作成する。担体とするPVDF膜は使用前にメチルアルコールに20秒間浸け、その後、0.3N NaOHに浸けておく。

【0026】希釈した標準DNA又はサンプルDNAはアガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離する。エチジウム・プロマイド染色により、アガロースゲル上でのDNA断片の分離を確認し、ポラロイドカメラにより写真撮影後、アガロースゲルは0.3N NaOH溶液に浸しDNAを1本鎖化する。キャビラリー法によりアガロースゲルからPVDF膜にDNA断片を移す。展開溶媒は0.3N NaOHを使用して、室温で一昼夜行なう。DNAが転写された膜は2×SSCで3回洗浄による中和後、風乾し、80℃、60分の加熱しDNAをより強固にPVDF膜に固定する。続いて、膜を5×SSC, 1%SDSで55℃、60分振盪下、洗浄する。洗浄後、膜はB u f f e r - 1 に浸しておく。

【0027】以下、DNAの標識、ハイブリダイゼーション及び免疫学的検出については実施例1と同様に行つた。

【0028】サザン・プロット法における最高検出感度を検討した結果、全DNA断片の添加における検出量は2.5pgを検出した。この結果は知見の100~1000倍に相当する。断片では4907, 2176, 1766, 1230, 1033のバンドが検出されているがこれは個別のバンドにおいて最高0.18pgを検出したことに相当する。

【0029】ミリポア社の“Immobilion Tech Protocol”においてImmobilion

- P (PVDF, PはProteinの意)の核酸の検出に利用したデータが示されている。放射能法によるPVDF膜とナイロン膜(Gene Screen Plus)との比較において両者2.5ngの検出感度で差がないことを示している。非放射能法の比較においては、PVDF膜は0.5ngを検出してナイロン膜より優れていることを示している。(ビオチン-ストレプトアビシン・ALP検出系)。このデータから非放射能法は放射能法に比して5倍高い検出感度を示していることがわかる。これらに比し、本法ではジゴキシゲニン標識による抗ジゴキシゲニン・ALP検出系とPVDF膜の組み合わせにおいて、2.5pgを検出しており放射能法に対しては1000倍、非放射能法に対しては200倍の高い検出感度を有するといえる。

【0030】(実施例3) 放射能法による規格試験で検定したサンプルを用いてDNA分析を行った。

#### 【0031】ドット・プロット法

B型肝炎ウイルス表面抗原産生細胞CHOより産生された表面抗原を含む培養液を集め、数々の精製工程を経て精製された表面抗原(ワクチンになる)のバルク(製剤の前の状態)溶液0.5ml(表面、抗原として200μg)をサンプルDNAとして用いる。

【0032】標準曲線用のDNAとして、CHO細胞由来のDNAを用いる。細胞を集め(約10<sup>8</sup>個)0.5%SDSを含む50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0を加えて細胞を破壊し、100μg/mlのProteinase-K(シグマ社製)を加えて、68℃、3時間のインキュベーションにより細胞由来蛋白質を分解する。次いで、フェノール処理、エタノール沈殿によりDNA、RNA混合物を抽出する。DNAを取得するためDNases(DNA分解酵素)を含まないRNases(RNA分解酵素)によりRNAを分解する。RNAを取得する場合はこの逆の操作を行なう。再度、フェノール処理、エタノール沈殿により精製DNAを得る。これを用いて、希釈用緩衝液TEにより適当な希釈系列を作成する。

【0033】以下、実施例1と同様に処理し、PVDF膜への拘持を行う。

#### 【0034】DNAの標識

前述精製DNA 1μgを5分間、超音波処理により断片化し、実施例1と同様にして、プライマー伸長法により、Dig-dUTPを取り込ませる。

【0035】以下、ハイブリダイゼーション及び免疫学的検出については、実施例1と同様に行った。その結果、CHO-DNAによるドット・プロットはDNA濃度に依存して着色を呈した。最高検出感度1.25pgのスポットを容易に確認でき、それ以上の感度の検出が可能なことを示唆した。又この感度は、放射能法と同等であった。規格試験法に要求される検出感度は10pg以下であり本法はこれをクリアしている。この結果

は、非放射能法への転換の可能なことを示すものである。本法によるサンプル中のCHO由来のDNAの測定では紫色のスポットは示さなかった（放射能法と同結果）。よって、精製表面抗原200μgサンプル中（投与量の10倍量）にはCHO由来のDNAは許容量以下であることを確認した。

## 【0036】

【発明の効果】本発明方法によれば、放射性標識を用いなうため、経費及び使用上の制約がなく、また、操作時間も短縮し、目的とするDNA及びRNAを検出することができる。本発明方法は、遺伝子診断、生物製剤規格試験、法医学面等、いろいろな分野で有用である。